

三丁基锡对小鼠性腺发育的影响及其机制的初步研究

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 20120051301983

UDC_____

厦门大学

硕士学位论文

三丁基锡对雄性小鼠性腺发育的影响及其 机制的初步研究

Effects of Tributyltin on the development of Gonad in Male
Mice and Potential Mechanism

陈瑜芳

指导教师姓名: 陈奕欣 教授

专业名称: 动物学

论文提交日期: 2008 年 06 月

论文答辩时间: 2008 年 07 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: 杨增明

评阅人: _____

2008 年 07 月

三丁基锡对雄性小鼠性腺发育的影响及其机制的初步研究

陈瑜芳

指导教师: 陈奕欣 教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要

Abstract

第一章 前言	1
一、有机锡的污染现状	1
二、有机锡对哺乳动物的生殖毒性	2
三、小鼠性腺发育调控机制	3
1 小鼠性腺的功能形态学	3
2 细胞增殖和细胞凋亡	4
3 性激素及其受体	5
四、研究的目的、意义和主要内容	7
第二章 材料和方法	9
一、实验材料	9
二、仪器和试剂	9
1 实验仪器	9
2 常用试剂	9
三、污染实验	9
1 剂量设置和染毒	9
2 取样	10
四、精子质量检测	10
1 精子密度检测	10
2 精子存活率计算	10
3 精子畸形观察	10
五、组织学	11
1 HE染色	11
2 性腺组织学分析	11

3	免疫组织化学.....	11
4	TUNEL 检测细胞凋亡	12
六、	Western blotting 分析	13
1	样品预处理.....	13
2	SDS--聚丙烯酰胺凝胶电泳与 Western blotting 试剂配方	13
3	SDS--聚丙烯酰胺凝胶电泳与 Western blotting 分析	14
七、	性腺激素测定	14
1	性腺预处理.....	14
2	测定方法	14
八、	数据处理	15
第三章	结果	17
一、	TBT 暴露对雄性小鼠睾丸发育的影响	17
1	TBT 暴露对雄性昆明小鼠体重、睾丸重量的影响	17
2	TBT 暴露对雄性昆明小鼠精子发生的影响	17
3	TBT 暴露对雄性昆明小鼠睾丸的组织学的影响	19
4	TBT 暴露对雄性昆明小鼠睾丸的 PCNA 蛋白表达的影响	22
5	TBT 暴露对雄性昆明小鼠睾丸细胞凋亡的影响	24
6	TBT 暴露对雄性昆明小鼠睾丸内睾酮激素和 17 β --雌二醇水平的影响	26
7	TBT 暴露对雄性昆明小鼠睾丸内睾酮激素受体和雌激素受体 α 和 β 表达的 影响	28
第四章	讨论	31
一、	TBT 暴露对雄性昆明小鼠体重和睾丸重量的影响	31
二、	TBT 暴露对雄性昆明小鼠睾丸组织学的影响	32
三、	TBT 暴露对雄性昆明小鼠精子发生和睾丸细胞增殖的影响	32
四、	TBT 暴露对雄性昆明小鼠睾丸细胞凋亡的影响	34
五、	TBT 暴露对雄性昆明小鼠睾丸激素水平的影响	34
六、	TBT 暴露对雄性昆明小鼠睾丸激素受体水平的影响	36
结论	39

参考文献.....	41
硕士阶段发表的论文	57
致 谢.....	59

厦门大学博硕士论文摘要库

CONTENTS

ABSTRACT (IN CHINESE)

ABSTRACT (IN ENGLISH)

Chapter 1 Introduction	1
I Pollution of organotin compounds	1
II Reproduction toxicity of organotin compounds in mammals	2
III Mechanism of gonad development in mice	3
Morphography and function of gonad in mice	3
Proliferation and apoptosis of cells in gonad	4
Sex hormone and estrogen/androgen receptor	5
IV Research objectives	5
Chapter 2 Materials and methods	9
I Materials	9
II Instruments and reagents	9
Experiment instruments	9
Common reagents	9
III TBT exposure	9
Dose setting and exposure	9
Sampling	10
IV Sperm quality analysis	10
Sperm density analysis	10
Sperm livability analysis	10
Sperm abnormality analysis	10
V Histology	11
Staining with H.E.	11
Histological analysis of gonad	11
Immunohistochemistry	11

TUNEL assay	12
VI Western blotting analysis	13
Tissue preparation	13
Reagents	13
Procedure	14
VII Sex hormone analysis	14
Sampling and tissue preparation	14
Methods	14
VIII Data processing	15
Chapter 3 Results	17
I Effect of TBT on the development of testes in male mice	17
Effect of TBT on the body weight and weight of testes in male mice	17
Effect of TBT on the spermatogenesis in male mice	19
Effect of TBT on the histology of testes in male mice	22
Effect of TBT on the PCNA expression of testes in male mice	23
Effect of TBT on cell apoptosis of testes in male mice	24
Effect of TBT on the testosterone and estradiol of testes in male mice	26
Effect of TBT on the androgen receptor and estrogen receptor α/β expression of testes in male mice	28
Chapter 4 Discussion	31
I Effect of TBT on the body weight and weight of testes in male mice	31
II Effect of TBT on the histology of testes in male mice	32
III Effect of TBT on the spermatogenesis and cell proliferation of testes in male mice	32
IV Effect of TBT on cell apoptosis of testes in male mice	34
V Effect of TBT on the sex hormone testes in male mice	34
VI Effect of TBT on the sex hormone receptor of testes in male mice	36
Conclusions	39

References	41
Publications	57
Acknowledgements	59

厦门大学博硕士论文摘要库

中文摘要

三丁基锡 (TBT) 是一种重要的有机锡类化合物, 在环境中大量使用, 具有很强的毒性。近年, 许多研究表明TBT对软体动物和鱼类生殖机能产生影响, 但是有关对哺乳动物的生殖影响报道较少。本实验以青春期雄性小鼠为研究对象, 在生态条件下和环境污染浓度范围内, 采用不同浓度TBT (0.5、5、50 $\mu\text{g/kg}$) 对其进行灌胃染毒, 每三天灌胃一次, 暴露30天。通过光学显微镜观察精子质量; 放射免疫法检测睾丸性激素水平; western blotting 方法检测性激素受体水平以及PCNA表达水平; 并利用TUNEL法检测细胞凋亡情况, 最终分析TBT对雄性小鼠性腺发育的影响及其作用机理。

实验结果如下:

1. TBT 暴露 30 天后, 青春期雄性小鼠体重没有出现显著变化, 性腺指数呈剂量一依赖性下降, 高浓度组出现显著性差异。组织学观察发现低浓度组和中浓度组曲细精管内细胞少量脱落, 而高浓度组管内细胞层数则大幅减少, 精细胞脱落, 分布散乱;
2. TBT 暴露影响了小鼠精子发生, 通过对小鼠附睾精子质量的检测, 结果表明附睾中的精子数量和精子存活率与对照组相比都有显著性下降, 中浓度组和高浓度组的畸形率显著上升, 且都呈剂量一效应关系;
3. TBT 暴露 30 天后, 免疫组化等方法发现 TBT 降低 PCNA 在精细胞中的表达水平, 表现出剂量一效应性关系, 其中中浓度和高浓度与对照组相比都有显著性差异; TUNEL 实验显示 TBT 暴露能够诱导睾丸细胞的凋亡, 且凋亡主要发生在精原细胞和精母细胞中, 也呈剂量一效应关系;
4. TBT 暴露后小鼠睾丸中睾酮水平没有显著变化, 但 17β -雌二醇水平却呈剂量一依赖性下降, 其中 50 $\mu\text{g/kg}$ 组的 17β -雌二醇水平与对照组相比有显著性差异, 同时 western blotting 还显示在 5 $\mu\text{g/kg}$ 和 50 $\mu\text{g/kg}$ 暴露组中, TBT 显著抑制睾丸雌激素受体 (ER- α 和 ER- β) 的水平, 提高小鼠睾丸中雄激素受体 (AR) 的表达, 并都呈剂量一效应性关系。

综上所述, 低剂量的 TBT 暴露能够抑制雄性小鼠性腺的发育, 影响精子的发生。同时, TBT 使睾丸中 17β -雌二醇水平产生下降, 表明 TBT 诱导的激素水平的变化是其抑制性腺发育的机制之一。另外, 在本实验中, 由于 TBT 的作用,

小鼠睾丸性激素受体水平受到明显影响，精细胞凋亡增加，这也为 TBT 抑制性腺发育提出了新的机制。

关键词： 三丁基锡； 雄性小鼠； 性腺发育

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

As an important organotin compound, tributyltin (TBT) is widely used and has intense toxicity. Reproductive toxicity induced by TBT in mollusk and fish has been demonstrated extensively in recent years. However, few studies addressing the effect of TBT on reproduction of mammals have been reported. This study was conducted to investigate effects of TBT at low doses (0.5, 5, and 50 $\mu\text{g/kg}$, respectively) on the development of gonad in male KM mice as exposed from puberty and insighted into the mechanism. Thirty-two mice were divided into four groups randomly and orally administered by gavage once every 3 day with TBT (lasting 30 days). The quality of sperms were observed directly by light microscope; the sex hormone levels were detected by radio-immunoassay (RIA) method; androgen receptor, estrogen receptor and PCNA expression were evaluated by western blotting method; and the cell apoptosis was detected with method of TUNEL.

The results were shown as below:

1. After exposure for 30 days, though the body weight of male mice treated with TBT was not significantly altered, the gonadosomatic indexes of the mice were decreased in a dose-dependent manner, and a significant decrease was observed in 50 $\mu\text{g/kg}$ TBT groups compared to the control. A small quantity of sloughed cells in seminiferous tubules was found in 0.5 $\mu\text{g/kg}$ and 5 $\mu\text{g/kg}$ TBT group, but fewer layers of seminiferous epithelium and increments of detached debris and more sloughed cells in seminiferous tubules of the testis were found in 50 $\mu\text{g/kg}$ TBT group by histological examination;
2. TBT treatment resulted in degeneration of spermatogenesis. According to the detection of sperm quality, we found TBT significantly decrease the sperm count and viability in 5 $\mu\text{g/kg}$ and 50 $\mu\text{g/kg}$ TBT groups compared to the control, while significantly elevate the sperm abnormality in 5 $\mu\text{g/kg}$ and 50 $\mu\text{g/kg}$ TBT groups both in a dose-dependent manner;
3. The positive expression of PCNA in seminiferous epithelium in the experimental male mice was caused a dose-dependant decrease after TBT treatment by

immunohistochemistry analysis, and compared to the control, a significant decrease was detected in 5 µg/kg and 50 µg/kg TBT groups. Also, an increase of cell apoptosis in a dose-dependent manner induced by TBT was observed in testes, and it showed that the TUNEL-positive cells detected were mainly in spermatogonia and spermatocyte;

4. Exposure to TBT resulted in a decrease of 17β-estradiol levels of the testes in 50 µg/kg group compared to the control, but no significant alteration of testosterone level between the treated groups and the control. TBT treatment also resulted in a decrease of ER-α and ER-β expression in a dose-dependent manner, and it has a significant decrease in 5 µg/kg and 50 µg/kg TBT groups compared with the control. However, AR levels were increased in a dose-dependent manner in the testes of the mice, and a significant increase was also observed in 5 µg/kg and 50 µg/kg TBT groups.

In conclusion, the results strongly suggest that TBT exposure at low dose suppress the development of testis, cause decrease of spermatogenesis, and cause the decrease of the 17β-estradiol levels. The changes of sex hormone induced by TBT should be one of reasons that TBT affects the gonad development. Moreover, the increase of apoptosis in testis and the disruption of sex hormone receptors expression found in this study, especially the latter may be intensively involved in the mechanism on affecting the gonad development.

Keyword: tributyltin; male mice; gonad development

第一章 前言

一、有机锡污染现状

有机锡是一类至少含有一个 $\text{Sn}-\text{C}$ 共价键的化合物的总称, 分子式为 $\text{R}_n\text{SnX}_{4-n}$, R 代表烷基或烷基基团, n 为 1-4(即有四种可变的有机锡形式), X 为阴离子或阴离子基团(F^- , Cl^- , OH^-)。有机锡化合物的性质和毒性主要取决于有机基团及其性质, X 对它的性质没有什么大的影响, 除非 X 基团本身有毒性。三丁基锡 (Tributyltin, TBT) 是有机锡类化合物中比较重要的一种, 占总有机锡产量的 25—30%。由于有机锡具有热稳定性、初期着色性和透明性等优异性能^[1,2], 被用作木材防腐剂、聚氯乙烯塑料制品的热稳定剂和工业用冷凝水的灭菌剂, 但其最主要的用途, 是作为杀虫剂添加到涂料中涂于船体及海洋建筑的表面防止软体海洋生物如海草、软体动物、藤壶及海绵的附着^[3]。由于有机锡能有效防止软体海洋生物对船体的附着, 减少海运的总体花费, 取得更大的经济效益, 在二十世纪七八十年代它被广泛运用于船舶及海洋建筑中。

但是在产生巨大效益的同时, TBT 的大量使用对生态环境的危害也逐渐显现出来, 它已造成世界大多数港口和内陆水域的污染, 而且被认为是迄今为止由人为因素而导致大量进入生态环境中的毒性最大的化学品之一。1974 年联合国海洋污染防治公约就将有机锡列入优先控制的灰名单, 1976 年的莱茵公约又把 5 种毒性特别大的有机锡化合物列入必须严格控制的黑名单^[4]。1982 年法国政府在对有机锡污染状况调查研究的基础上, 率先实行限制有机锡海洋防污涂料的使用^[5]。到了 20 世纪 80 年代末 90 年代初, 美国、英国、加拿大、日本、西班牙等各国都陆续实行限制或禁止有机锡涂料的生产和使用。尽管如此, 由于有机锡在生态环境中的长期残留, 在限制使用近 10 年后, 环境中的有机锡含量仍无明显下降。

TBT 不但可以直接对海洋生物产生巨大的毒性作用, 而且不可忽视的是它在生物体内具有高富集性。即便在外界有机锡浓度很低的情况下, 一些生物也会对 TBT 进行迅速、有效的富集, 其 BCF 值 (生物富集系数) 相当大, 很易引起累积性中毒^[6]。TBT 从防污漆中溶出进入水体后, 一部分在水中光的影响和微生物 (细菌、藻类以及真菌) 的作用下发生降解, 速度较快, 半衰期一般是几天或几周, 生成毒性较小的 DBT (二丁基锡, Dibutyltin) 和 MBT (一丁基锡,

Monobutyltin)^[7]；一部分在生物体内存留，因为 TBT 可依靠其高度的脂溶性而具有良好的胞膜渗透性，这部分 TBT 最终或经食物链传递给上一营养层，或随生物死亡后沉降到海底，还有一部分通过吸附在颗粒物上沉降到海底。因此，海底沉积物也是 TBT 富集的一个重要场所^[8, 9, 10]。李中阳等（2003）实验还发现即使经过蒸煮烹调后 TBT 仍然存在，提示海产品中 TBT 的存在对人具有潜在危害^[11]。Devieretal et al.（2003）研究证明了 TBT 可以在水生生物体内富集，更加不容忽视的是这些水生生物被人食用后可能影响到人类健康^[12]。因此，国际海事组织将 TBT 的每日容许摄入量（TDI）定为 $1.6 \mu\text{g/kg} \cdot \text{d}$ ；根据对免疫功能的研究，Penninks 建议为 $0.25 \mu\text{g/kg} \cdot \text{d}$ ；联合国粮农组织/世界卫生组织（FAO/WHO）则建议为 $0.5 \mu\text{g/kg} \cdot \text{d}$ 。

有机锡化合物主要通过呼吸道、消化道和皮肤黏膜进入动物机体，分布于体内多种器官中，并且能够在机体内长期蓄积。大量研究表明，TBT 可对哺乳动物的消化系统、呼吸系统、免疫系统、神经系统以及生殖系统造成不同程度的损伤^[13, 14, 15, 16, 17]。

二、有机锡对哺乳动物的生殖毒性

哺乳动物的生殖系统在下丘脑—垂体—性腺轴的调节下，由下丘脑分泌促性腺激素释放激素，刺激垂体分泌促性腺激素，后者作用于性腺器官分泌性激素，性激素与性腺等靶器官组织受体结合，形成受体配体复合物，并与特定的 DNA 序列结合，通过靶基因的转录翻译，发挥生理生化作用。在此调节作用下机体进行有序的生殖生命活动，维持体内的稳态，保持成年后第二性征。研究表明，环境中的许多化学物质都具有干扰内分泌系统的作用，这些化合物影响生物的生殖功能，干扰体内激素的分泌，造成生殖和遗传方面的不良后果^[18, 19, 20, 21]。这些物质被称为内分泌干扰物质，有机锡化合物便是其中的一类。

近年，已有许多研究表明 TBT 能导致多种雌性软体动物的性反转，主要表现为雌性动物出现一些不正常的雄性性征^[22, 23, 24, 25, 26]。在海洋鱼类中，种群中雌性个体比例下降，幼体数目减少，最终导致种群的衰退^[27, 28]。相较 TBT 对海洋鱼类的研究，对哺乳动物的研究特别是对哺乳动物的生殖系统影响研究则较少。

Davis et al.（1987）研究了氧化三丁基锡（TBTO）对 NMRI 小鼠的生殖毒

性作用。发现在 10 天的毒性研究中, TBTO 的 LD_{50} 和 LD_{10} 分别为 74 和 34 mg/kg, 给孕期小鼠口服 TBTO 11.7, 23.4, 35 mg/kg, 幼鼠腭裂的发生率分别升高了 7%、24%、48%^[29]。Baroncelli et al. (1995) 发现在孕期的 6~15 d 给予 Swiss 小鼠口服 0、5、10、20 和 30 mg/kg 体重的 TBTO 后, 多数处理组 (除 5 mg/kg 组外) 母鼠在怀孕的后期体重下降, 怀孕时间显著延长。在 20 和 30 mg/kg 组, 发现出生时的小鼠体重减轻, 出生后胎仔的死亡率和生长率受到母亲行为改变的影响, 幼鼠分散在笼子里, 并有受伤的痕迹。10、20 和 30 mg/kg 处理组未筑巢的母鼠增加, 母鼠不照顾幼鼠, 并有杀子行为^[30]。Ogata et al. (2001) 也发现怀孕 Wistar 大鼠口服 5、25、125 ppm 氯化三丁基锡 (TBTCI) 后, 125 ppm 组胎仔的数目和体重以及存活率显著下降, 雌性胎仔的生长也显著下降, 并发现阴道张开延迟, 动情周期削弱。而在所有处理组中, 出生后的大鼠肛门与生殖器的距离增加, 并存在剂量-效应关系, 这表明 TBTCI 可能会引起雌性新生大鼠的雄性化^[31]。这些研究表明 TBT 具有很强的哺乳动物胚胎毒性, 影响胚胎的正常发育、性别分化。有关 TBT 对雄性动物生殖的影响, Grote et al. (2004) 用 15 mg/kg TBT 和 6mg/kg TPT 暴露青春期大鼠, 结果显示它能扰乱雄鼠体内雌激素和雄激素水平的平衡, 引起性腺组织结构变化, 显著影响其生殖发育^[32]。还有研究表明, 青春期雄性大鼠染毒 TBT 后, 严重影响了睾丸和附睾中的精子数量和精子活力的一些重要参数, 导致精子发生紊乱^[33]。Omura et al. (2001) 也曾报道每天以 10 mg/kg 水平 TBT 暴露雄性大鼠, 不仅致使睾丸组织形态发生变化, 精子数量也大幅下降^[34], 但是目前由于对雄性哺乳动物的生殖发育研究较少, 其中引起这些变化的机制尚不明确。

三、小鼠性腺发育调控机制

1. 小鼠性腺的功能形态学

雄鼠的睾丸结构呈椭圆形, 存在于体后侧, 由许多个锥形小叶组成, 每个小叶含 1-4 条曲细精管。曲细精管是一种特殊的复层上皮, 含有两种上皮细胞: 一是各级生精细胞, 其中最靠近曲细精管管壁的为精原细胞, 它通过有丝分裂和减数分裂形成各级精母细胞和精子细胞, 最后产生精子, 当精子形成后, 成熟的精子进入附睾 (形成过程见下图示 1); 另一种是支持细胞 (Sertoli cell), 从精原细胞到形成成熟精细胞的过程中, 支持细胞起着提供营养的作用^[35], 其数目与精

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库